

To summarize, the present investigations has shown that in the zona reticularis of the young adult rat a) the images suggesting cell degeneration are extremely rare; b) the cells display all the morphological features of the actively steroidsecreting elements; c) the cell responsiveness to ACTH is quite similar to that of the zona fasciculata elements.

In conclusion, these results and the demonstration that the cells of the zona reticularis are well endowed with ACTH-receptors<sup>10</sup>, support the view that the zona reticularis, at least in the adult rats, cannot be merely

considered the site of destruction of worn-out elements migrating from the outer zones, but that this zone is actively involved in steroid synthesis. The differences in the morphology and proliferative capacity between the cells of the zona fasciculata and zona reticularis require, however, further investigations to settle their functional significance.

<sup>10</sup> M. P. GOLDER and A. R. BOYNS, J. Endocr. 53, 277 (1972).

## Struktur-Wirkungsbeziehungen beim menschlichen Calcitonin. III.<sup>1</sup> Die biologische Aktivität verkürzter oder an den Kettenenden modifizierter, synthetischer Analog<sup>2</sup>

### Structure-Activity Relationship of Human Calcitonin. III. Biological Activity of Synthetic Analogues with Shortened or Terminally Modified Peptide Chains

W. RITTEL, R. MAIER, M. BRUGGER, B. KAMBER, B. RINKER und P. SIEBER

Forschungslaboratorien der Division Pharma der Ciba-Geigy AG., CH-4002 Basel (Schweiz), 15. September 1975.

**Summary.** Assays of 8 synthetic analogues of human calcitonin in rats showed that their hypocalcaemic activity was drastically reduced by deletion of the C-terminal amide group, chain-shortening or opening of the disulphide ring, but unaffected or enhanced by modification of the N-terminal amino group.

Die bisher aus verschiedenen Arten isolierten Calcitonine<sup>3</sup> weisen überraschend grosse Unterschiede in ihren Aminosäuresequenzen auf. Dagegen besitzen alle als gemeinsame Strukturmerkmale eine Kette von 32 Aminosäuren mit einem C-terminalen Prolin-amidrest, sowie einen Disulfidring zwischen den Halbcystinresten in den Positionen 1 und 7. Die Tatsache, dass Amino- und Carboxylen unverändert erhalten werden, trotz einer hohen Austauschrate der übrigen Aminosäuren, deutet darauf hin, dass die Kettenenden zur Erhaltung der biologischen Aktivität notwendig sind. Mit dieser Annahme stimmen unsere früher<sup>4</sup> bei Abwandlung von Schweinecalcitonin (PCT)-peptiden gemachten Beobachtungen überein. Wir haben zeigen können, dass bereits geringfügige Änderungen am Carboxylende von PCT die biologische Aktivität stark erniedrigen.

Eine entsprechende Untersuchung wurde jetzt auch auf menschliches Calcitonin (HCT, Calcitonin M<sup>5</sup>) aus-

gedehnt. Dazu dienten die in der Tabelle angegebenen synthetischen Analogen, die entweder eine verkürzte Peptidkette oder Abwandlung an den Kettenenden aufweisen.

Diese Substanzreihe umfasst als C-terminal veränderte Peptide die freie C-terminalen Säure HCT-(1-32)-OH, den entsprechenden Methylester HCT-(1-32)-OMe und die um eine beziehungsweise drei Aminosäuren verkürzten Sequenzen HCT-(1-31)-NH<sub>2</sub> und [Pro<sup>29</sup>]-HCT-(1-29)-NH<sub>2</sub>. In letzterem Analogen ist der natürlicherweise in Stellung 29 vorkommende Valin- durch einen Prolinrest ersetzt. Dadurch sollte abgeklärt werden, ob Aktivität erhalten bleibt, falls bei verkürzter Kette eine C-terminalen Prolinamidfunktion vorhanden ist, wie beim HCT selbst. [Ser<sup>2</sup>,Des-Gly<sup>10</sup>]-HCT ist um eine Aminosäure (Gly<sup>10</sup>) im Ketteninnern verkürzt, enthält also die Calcitonin-Sequenzen 1-9 und 11-32 miteinander verknüpft. Zudem enthält dieses Analoge noch einen Serin-Rest in Stellung 2, wie er bei den andern Säuger-Calcitoninen auftritt. Als N-terminal abgewandelte Sequenzen wurden [Bmp<sup>1</sup>]-HCT, [N<sup>α</sup>-Acetyl-Cys<sup>1</sup>]-HCT sowie die offenkettige Sequenz [NMet<sup>1,7</sup>]-HCT in der die beiden Cysteinreste in Stellung 1 und 7 methyliert sind, dargestellt.

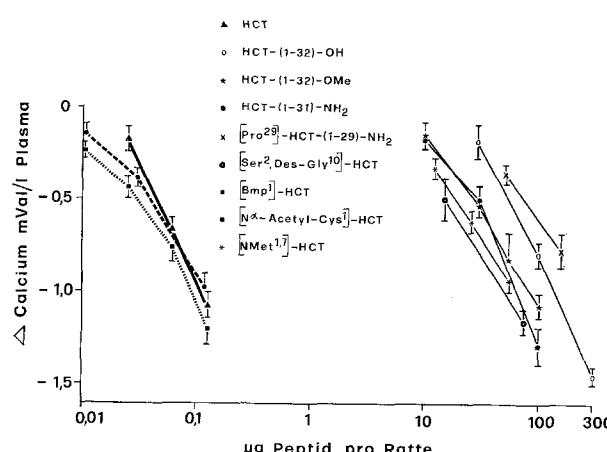


Fig. 1. Dosis-Wirkungsbeziehung der hypocalcaemischen Aktivität gemessen 50 Min nach i.v. Applikation der Peptide. Jeder Punkt repräsentiert das Mittel aus 15 Messwerten ( $\pm$  Standardfehler).

<sup>1</sup> II. vgl. R. MAIER, B. KAMBER, B. RINKER and W. RITTEL, Hormon, Metab. Res. 7, 511 (1975).

<sup>2</sup> Die hier verwendete, abgekürzte Schreibweise für Peptide folgt den Empfehlungen der IUPAC-IUB Kommission für Biochemische Nomenklatur, J.B.C. 247, 977 (1972). Weitere Abkürzungen: HCT, Human-Calcitonin; PCT, Schweinecalcitonin; Bmp,  $\beta$ -Mercapto-propionsäure (Desaminocystein); NMet, Normethionin (S-Methylcystein); -OMe, Methylester.

<sup>3</sup> Als Übersicht vgl. J. T. POTTS, H. D. NIALL, H. T. KEUTMANN, L. J. DEFTOS und J. A. PARSONS, in *Calcitonin 1969* (Eds. S. TAYLOR und G. FOSTER; W. Heinemann, London 1970), p. 56.

<sup>4</sup> P. SIEBER, M. BRUGGER, B. KAMBER, B. RINKER, W. RITTEL, R. MAIER und M. STAHELIN, in *Calcitonin 1969* (Eds. S. TAYLOR und G. FOSTER; W. Heinemann, London 1970), p. 28.

<sup>5</sup> R. NEHER, B. RINKER, W. RITTEL und H. ZUBER, Helv. chim. Acta 51, 1900 (1968).

## Synthetische Analoge von HCT

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	Relative Aktivität *
HCT H-Cys-Gly-Asn-Leu-Ser-Thr-Cys-Met-Leu-Gly-Thr-Tyr-Thr-Gln-Asp-Phe-His-Thr-Phe-Pro-Gln-Thr-Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro-NH <sub>2</sub>																																	
1 H-Cys-	-Cys-																																
2 H-Cys-		-Cys-																															
3 H-Cys-			-Cys-																														
4 H-Cys-				-Cys-																													
5 H-Cys-Ser-					-Cys-																												
6 Bmp-						-Cys-																											
7 Ac-Cys-							-Cys-																										
8 H-NMet-								-NMet-																									

1, HCT-(1-32)-OH (C-terminal Säure); 2, HCT-(1-32)-OME (C-terminaler Methylester); 3, HCT-(1-29)-NH<sub>2</sub>; 4, [Pro<sup>39</sup>]-HCT-(1-29)-NH<sub>2</sub>; 5, [Ser<sup>2</sup>, Des-Gly<sup>10</sup>]-HCT; 6, [Bmp<sup>1</sup>]-HCT (Desamino-Cys<sup>1</sup>); 7, [N<sup>α</sup>-Acetyl-Cys<sup>1</sup>]-HCT; 8, [NMet<sup>1,7</sup>]-HCT (offenkettiges Derivat). \* Die biologische Aktivität ist im Verhältnis zu derjenigen von HCT (= 100) angegeben; sie ist berechnet aus den in Figur 1 angegebenen Kurven.

**Synthetische Peptide und Synthesemethodik.** Zur Herstellung aller Analoger diente die Fragment-Kondensationsmethode in der Form, die wir früher zur Totalsynthese von HCT<sup>6</sup> und PCT<sup>7</sup> ausgearbeitet und detailliert beschrieben haben. Wir erhielten die Analogen in Form ihrer wasserlöslichen, essigsauren Salze. Sie erwiesen sich anhand der von SIEBER et al.<sup>6</sup> für HCT angegebenen Dünnschicht-Chromatographie und -Elektrophoresesystemen als einheitlich. Alle geben nach Totalhydrolyse stimmende Aminosäurenanalysewerte.

**Biologische Prüfung. a) Wirkstärke.** Die Prüfung auf Wirkstärke erfolgte im Wesentlichen nach KUMAR et al.<sup>8</sup>. Die Peptide wurden in Natriumacetatpuffer (pH 4,6) mit Zusatz von 0,1% Rinderserumalbumin gelöst und 100–120 g schweren, weiblichen Albinoratten i.v. gespritzt. Die Bestimmung der Calciumkonzentration im Plasma erfolgte mittels Flammenphotometrie 50 Min nach Injektion. In dieser Testanordnung zeigt HCT eine Schwellendosis von 25 ng/kg, während 125 ng/kg bereits volle Wirkung ausüben.

**b) Wirkdauer.** Zur Prüfung auf Wirkdauer wurden generell 30 µg/kg Peptid s.c. injiziert und die Calciumkonzentration im Plasma in einstündigen Intervallen bestimmt.

**Resultate.** Figur 1 zeigt die Dosis-Wirkungskurven aller Analoger im Vergleich zu derjenigen von HCT. In der Tabelle sind die daraus resultierenden Wirkstärken wiedergegeben.

Alle Präparate besitzen eindeutige hypocalcaemische Wirkung, allerdings in zum Teil stark verschiedener Größenordnung. Die Präparate [Bmp<sup>1</sup>]- und [N<sup>α</sup>-Acetyl-Cys<sup>1</sup>]-HCT wurden zudem noch auf ihre Wirkdauer geprüft; die Resultate sind in Figur 2 wiedergegeben. Beide zeigen gegenüber HCT eine leicht verlängerte Wirkung. Während die Plasma-Calciumwerte nach Applikation von HCT nach 2 h wieder signifikant angestiegen sind, bleiben sie zu diesem Zeitpunkt nach Injektion der beiden Analogen noch maximal gesenkt.

**Diskussion.** Wie beim PCT führen auch beim HCT geringfügige Veränderungen am Carboxylende zu starkem Wirkungsverlust. Er ist hier allerdings noch ausgeprägter. Ersatz der C-terminalen Carboxamid- durch die Carboxy- oder Carboxymethylgruppe oder Verkürzung der Kette um auch nur eine Aminosäure senkt die Wirkung auf weniger als 1% derjenigen von HCT. Die niedrige Aktivität der freien C-terminalen Säure beruht offenbar nicht auf dem Auftreten einer zusätzlichen negativen Ladung am Carboxyende, da auch der C-terminalen Methylester nur sehr schwach aktiv ist. Die Kettenverkürzung unter Beibehalt einer C-terminalen Prolin-Amidfunktion oder durch Weglassen des Glycinrestes 10 lässt die Wirkung ebenfalls stark absinken<sup>9</sup>.

Dagegen führen Veränderungen am Aminoende zu unterschiedlichen Ergebnissen. Ringöffnung durch Ersatz der Cysteinreste in Position 1 und 7 durch Normethionine gab ein nur noch sehr schwach aktives Analoges. Acetylierung oder Ersatz der N-terminalen Aminogruppe durch

<sup>6</sup> P. SIEBER, B. RINIKER, M. BRUGGER, B. KAMMER und W. RITTEL, Helv. chim. Acta 53, 2135 (1970).

<sup>7</sup> B. RINIKER, M. BRUGGER, B. KAMMER, P. SIEBER und W. RITTEL, Helv. chim. Acta, 52, 1058 (1969).

<sup>8</sup> M. A. KUMAR, E. SLACK, A. EDWARDS, H. A. SOLIMAN, A. BAGHDANTZ, G. V. FOSTER und I. MACINTYRE, J. Endocrin. 33, 469 (1965).

<sup>9</sup> Das [Ser<sup>2</sup>, Des-Gly<sup>10</sup>]-Analoga enthält gegenüber HCT einen Serin-Rest in Stellung 2, wie er bei den andern Säuger-Calcitoninen vorkommt. Da diese ähnlich starke Aktivität wie HCT besitzen, dürfte der Wirkungsverlust von [Ser<sup>2</sup>, Des-Gly<sup>10</sup>]-HCT nicht durch diese zusätzliche Abwandlung bedingt sein.

Wasserstoff bewirkte dagegen eine schwache Erhöhung der Aktivität gegenüber HCT. Diese Wirkungserhöhung dürfte auf einer Hemmung des Abbaus, vermutlich durch Aminopeptidasen beruhen. Daraufhin deutet auch, dass beide Präparate,  $[Bmp^1]$ - und  $[N^{\alpha}\text{-Acetyl-Cys}^1]$ -HCT leicht verlängerte Wirkung besitzen.

Interessanterweise zeigen alle Präparate, auch die am schwächsten wirksamen, Dosis-Wirkungskurven die praktisch parallel zu denjenigen von HCT verlaufen. Wir schliessen daraus, dass alle Präparate eine gleiche, spezifische und direkte Wirkung ausüben, wie HCT selbst. Bei der Applikation hoher Dosen wenig aktiver Präparate sind unspezifische oder indirekte Wirkung, z.B. durch Verdrängung endogenen, gewebsgebundenen Hormons, nicht von vornherein auszuschliessen.

Unsere Resultate zeigen, dass beim HCT, im Gegensatz etwa zu Gastrin, Parathormon oder ACTH, nicht ein begrenzter Teil (aktives Zentrum) der Peptidsequenz zur

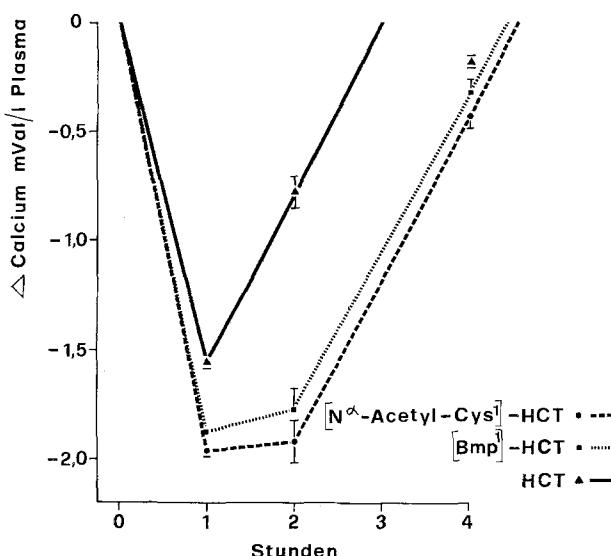


Fig. 2. Dauer der hypocalcaemischen Wirkung von  $[Bmp^1]$ - und  $[N^{\alpha}\text{-Acetyl-Cys}^1]$ -HCT im Vergleich mit HCT (30 µg/kg s.c.). Jeder Punkt repräsentiert die Messwerte von 10 Tieren ( $\pm$  Standardfehler).

Auslösung der Wirkung genügt. Offenbar ist dazu praktisch die gesamte Peptidkette notwendig. SCHWYZER<sup>10</sup> hat diesen Wirkstofftyp als «rhegnylogisch» bezeichnet. Diese Bezeichnung bedeutet, dass im betreffenden Peptid die zur Stimulation des Rezeptors notwendigen Bereiche getrennt sind und durch weniger wichtige Sequenzbereiche unterbrochen werden. Nach dieser Vorstellung müssten in einem solchen Peptidwirkstoff die Wirkbereiche durch eine relativ starre, vorgegebene räumliche Struktur in die richtigen sterischen Verhältnisse gezwungen werden. Auf Grund einer Analyse biologischer und immunochemischer Befunde haben BYFIELD et al.<sup>11</sup> für HCT eine bevorzugte Konformation vorgeschlagen. Darin soll das Carboxyende des Moleküls durch nichtkovalente Bindungskräfte auf den N-terminalen, cyclischen Bereich zurückgefaltet sein. Allerdings hat eine Studie mittels hochauflösender magnetischer Kernresonanzspektroskopie<sup>12</sup> keine Hinweise auf eine solche bevorzugte Struktur in Lösung für HCT ergeben. Diese Resultate stehen aber nicht unbedingt im Widerspruch zu denen von BYFIELD et al.<sup>11</sup>, da die bevorzugte Konformation dem Peptidhormon erst beim Zusammentreffen mit Antikörper- oder Rezeptormolekülen aufgezwungen werden könnte.

Die hier beobachteten Struktur-Wirkungsbeziehungen beim HCT zeigen eine überraschende Parallelität zu denen des chemisch ähnlich gebauten Hormons Oxytocin (als Übersicht vgl.<sup>13</sup>). Auch dort zeigen C-terminal verkürzte oder offenkettige Derivate starken Wirkungsabfall, andererseits besitzt auch Deaminooxytoxin eine etwas erhöhte Wirkung gegenüber dem unveränderten Hormon. Offenbar deuten diese sehr ähnlichen Struktur-Wirkungsbeziehungen von HCT und Oxytocin auf ein ähnliches metabolisches Verhalten beider Hormone in der Ratte.

<sup>10</sup> R. SCHWYZER, in *Peptides 1972* (Eds. H. HANSON und H. D. JAKUBKE; North Holland Publ. Co., Amsterdam 1973), p. 424.

<sup>11</sup> P. G. H. BYFIELD, M. B. CLARK, K. TURNER, G. V. FOSTER und I. MACINTYRE, Biochem. J. 127, 199 (1972).

<sup>12</sup> A. MASSON, Dissertation Nr. 5229, ETH, Zürich, 1974.

<sup>13</sup> B. BERDE und R. A. BOISSONNAS, in *Handbuch der experimentellen Pharmakologie* (Ed. B. BERDE; Springer-Verlag, Berlin 1968), vol. 23, p. 402.

## Epilepsy in Women. Oestrogen and Progesterone Plasma Levels<sup>1</sup>

T. BÄCKSTRÖM

Department of Physiology, University of Umeå, S-90187 Umeå (Sweden), 8 September 1975.

**Summary.** Comparison is made between numbers of fits and estrogen, progesterone plasma values during the menstrual cycle of women with epilepsy. All six cycles in women with ovulation had a significant positive correlation between estrogen/progesterone ratio and scores of fits. Three periods without ovulation all showed a significant correlation to estrogen variations.

It has long been known that in certain women suffering from epilepsy, the severity of fits varies with the menstrual cycle<sup>2,3</sup>. Therefore, a possible relationship to hormone levels has been suspected. In order to test this possibility we have measured oestrogen and progesterone on alternate days, in 7 women over 9 menstrual cycles, using a radioimmunoassay analysis. Of these women, 3 had cycles that were anovulatory and without a progesterone peak. The ovulatory cycles all showed a clearly significant correlation between oestrogen/progesterone

ratio and the scores of fits based on the number of fits and the severity of fits, i.e. more severe fits were scored higher than less severe fits ( $r = 0.52$ ,  $p < 0.025$ ;  $r = 0.64$ ,

<sup>1</sup> Acknowledgments. This work was supported by Gunvor och Josef Anér stiftelse, Med. fac. University of Umeå, The Swedish Medical Research Council (Proj. No. 2148) and Karl Oskar Hansson's fund.

<sup>2</sup> W. R. GOWERS, *Epilepsy and Other Chronic Convulsive Diseases* (William Wood and Co., New York 1885).

<sup>3</sup> J. LAIDLAW, Lancet 2, 1235 (1956).